黄杆菌发酵液中维生素 K_2 的提取、纯化及鉴定

尉鸿飞[1,2,#]，王鹏[1]，赵根海[1]，刘会[1]，王丽[1]，王晗[1,2]，吴荷芳[1]，方雪[1,2]，郑之明[1,*]

[1] 中国科学院合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所

[2] 中国科学技术大学

#第一作者，E-mail: hong.fei.wei@163.com

*通讯作者，E-mail: zmzheng@ipp.ac.cn

维生素 K_2（VK_2）是一类脂溶性甲萘醌类化合物，根据其侧链中异戊烯基单元个数的不同，可用 Menaquinone-n (MK-n, n=1~14) 表示。研究表明，VK_2 具有促凝血、预防及治疗骨质疏松症、帕金森症及心血管疾病等生理功能。利用微生物发酵生产的 VK_2 具有全反式侧链、生物相容性高等优势，作为食品和药品更易于被消费者接受。但是，其下游分离纯化过程中存在产物浓度低、成分复杂、纯化工艺繁琐、产品得率低等诸多问题，目前还鲜有高纯度 VK_2 制备工艺的报道。

黄杆菌可以合成 MK-5 和 MK-6 等 VK_2 同系物，本研究针对其发酵产物的特点，开发了一整套相应的分离纯化工艺。首先通过膜浓缩和离心的方法快速获得黄杆菌菌体，菌体经干燥后，采用甲醇进行固-液萃取，固-液比为 4:1（ml/g），萃取时间为 20 分钟，连续萃取 3 次，获得的 VK_2 甲醇萃取液的萃取得率可达 99.1%以上。然后，通过大孔树脂吸附层析，以甲醇/二氯甲烷=1/1（V/V）为洗脱液，可获得纯度约为 15%的 VK_2 粗品；再经过分子筛层析，在高径比为 255:15，二氯甲烷为流动相时，可获得纯度约为 57%的 VK_2 低纯度产品；之后，经过反相硅胶柱层析，分别以甲醇/二氯甲烷=9:1, 6:1, 3:1（V/V）依次进行梯度洗脱，即可分离并纯化各 VK_2 的同系物，其 HPLC 纯度均达 90%以上。最后采用冷却结晶的方法制得一系列淡黄色晶体。通过质谱、红外光谱及核磁共振氢谱检测，均符合相应的 VK_2 光谱特征，确定其为 MK-5 和 MK-6 晶体。经 HPLC 检测，MK-5 和 MK-6 晶体纯度分别达到 98.0%和 99.3%。经多次重复实验后，表明全套工艺稳定，产物回收率可以达到 88%以上。各填料经过 15 次重复利用后，其对 VK_2 的纯度及回收率无明显的影响。

本研究所建立的从黄杆菌发酵液中提取和纯化 VK_2 的方法具有工艺简单、处理能力大、产品纯度及得率高等优点，其为实现 VK_2 的生物制备及其产业化奠定了优化的基础。在整个的提取、纯化及结晶的过程中，只有两种有机溶剂被使用，这更有利于有机溶剂的回收利用和 VK_2 的规模化生产。

作者简介：尉鸿飞，1986.10-？在读博士研究生，现就读于中国科学院合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所，生物物理学专业，联系方式，E-mail: hong.fei.wei@163.com, Tel: 18205607896。